

B 14352.3 DB

1

PROCEDE DE DOSAGE D'UN ECHANTILLON BIOLOGIQUE OU
CHIMIQUE

DESCRIPTION

5 **DOMAINE TECHNIQUE**

La présente invention concerne un procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique.

Le domaine de l'invention est notamment celui des mesures de concentration de molécules
10 fluorescentes appelées fluorochromes contenues dans des solutions. De telles molécules sont utilisées pour doser la quantité d'une espèce biologique donnée. La quantité de molécules de cette espèce biologique est alors liée à la quantité de molécules fluorescentes.
15 Une mesure de l'intensité émise lors de l'excitation de ces molécules fluorescentes permet, par calibrage de l'appareil de mesure utilisé, de déduire la quantité ou la concentration de molécules biologiques. De telles mesures sont couramment utilisées en biologie, en
20 chimie et en physique.

Dans la suite de la description, pour des raisons de simplification d'exposé, l'invention est décrite dans ce domaine de mesures de fluorescence d'échantillons.

25

ETAT DE LA TECHNIQUE ANTERIEURE

De nombreux appareils de commerce, tels que les fluorimètres et les spectro-fluorimètres, permettent de mesurer la fluorescence d'une solution.
30 Ces appareils permettent d'effectuer une mesure dans

BEST AVAILABLE COPY

B 14352.3 DB

2

une cuve dont la géométrie est variable et fonction de l'application.

D'autres appareils de mesure en solution utilisent des capillaires comme cuve. Ce sont par exemple les systèmes de mesures pour appareil d'électrophorèse.

Dans tous ces appareils on mesure un échantillon placé dans une cuve, auquel on associe un détecteur unique.

10 Dans certaines applications de spectrofluorimétrie on utilise des détecteurs multiples. Le spectre d'émission des molécules fluorescentes est alors dispersé sur un capteur d'image afin de mesurer simultanément l'énergie dans toutes les longueurs d'onde, ce qui revient à associer un détecteur unique pour chaque intervalle spectral. Plusieurs pixels sont parfois associés dans la direction orthogonale à celle de la dispersion afin de réaliser une opération appelée « binning » qui permet d'augmenter le rapport signal sur bruit de chaque mesure spectrale en réduisant le bruit de lecture des détecteurs devant le flux de photons. Des détecteurs multiples sont également utilisés dans certains appareils multi-échantillons. La présence de plusieurs échantillons impose alors 25 l'emploi de plusieurs cuves et la mesure pour chaque échantillon est faite via un capteur d'image.

La sensibilité de détection de tels appareils est insuffisante pour doser de faibles quantités de molécules, typiquement de l'ordre du 30 picoMolaire, soit pour faire un diagnostic de maladie, soit pour étudier la pureté d'une solution. Certains

B 14352.3 DB

3

types de dosages sont même impossibles à faire en dessous d'une certaine concentration : dans le domaine des immuno-analyses (dosage des antigènes), le seuil de détection statistique de l'art connu, exprimé en concentration de cibles, le plus bas obtenu pour une mesure en solution est de l'ordre de la centaine de picoMolaire. Typiquement, les appareils de commerce en cuve ne permettent pas de mesurer une fluorescence en dessous d'une concentration de cibles de 1nM (nanoMolaire).

Pour diminuer la limite de détection on peut focaliser la lumière d'une source laser dans un très petit volume, comme cela est réalisé en électrophorèse capillaire. L'échantillon passe alors dans un capillaire de quelques centaines de micromètres de diamètre. La limite de détection obtenue est de l'ordre du nM, comme décrit dans le document référencé [1] en fin de description.

On retrouve une telle limite de détection en marqueurs dans un système complexe comportant une optique confocale intégrée scrutant l'intérieur d'un capillaire, comme décrit dans le document référencé [2].

Les systèmes de mesure utilisant des capillaires ne permettent pas un débit d'échantillon très grand, par exemple d'une dizaine à une centaine de microlitre/minute. Une mesure sur un échantillon de grand volume est donc impossible. Le prélèvement qui s'ensuit réduit l'échantillonnage moléculaire et augmente le seuil de détection. Par exemple, s'il est possible de détecter la présence d'une molécule unique

B 14352.3 DB

4

par des techniques de corrélation de fluorescence, comme décrit dans document référencé [3], le volume sondé est très faible, de l'ordre du femtolitre. Détecter une molécule dans un tel volume donne une
5 limite de détection de l'ordre du nM.

Pour augmenter la densité de puissance dans le volume excité on peut focaliser la lumière d'excitation. Comme l'émission de fluorescence est quasi proportionnelle à la quantité d'énergie reçue
10 lors de l'excitation, l'augmentation de la densité de puissance permet d'augmenter le nombre de photons émis en fluorescence. Pour un système de mesure bien conçu, comme c'est le cas de la plupart des instruments du commerce, plus le nombre de photons mesurés est grand
15 et plus l'incertitude relative de cette mesure est faible. Cette incertitude varie comme $1/\sqrt{N}$ où N est le nombre de photons transformés en électrons lors de la conversion par le détecteur. Ceci justifie le choix d'une augmentation de la densité de puissance dans le
20 volume excité. Cependant, une forte densité de puissance s'accompagne d'une photo-extinction d'autant plus rapide que l'énergie lumineuse est grande. Pour la mesure d'une très faible concentration de molécules fluorescentes, il faut alors exposer ce volume pendant
25 un temps supérieur au temps de photo-blanchiment, qui correspond à une propriété des molécules fluorescentes consistant à s'arrêter d'émettre de la lumière au bout d'un certain temps. Il est alors impossible de collecter suffisamment de photons pour atteindre le
30 seuil de détection requis.

B 14352.3 DB

5

Des facteurs de limitation du seuil de détection résident dans l'auto-fluorescence des liquides, qui est une fluorescence intrinsèque de ces milieux, et dans la diffusion Raman. Le niveau de lumière émis réduit, en effet, les performances de détection car l'« offset » de photoluminescence du tampon utilisé est de même nature que le signal, dit « spécifique », que l'on veut détecter. Si le système de mesure est seulement limité par le « bruit de grenaille », dit également « bruit de photons », alors le plus petit signal mesurable au sens statistique S_{\min} est égal à $3 \times \sqrt{\text{Offset}}$, où « Offset » est une mesure exprimée en électrons primaires (électrons résultants directement de la conversion des photons par une photo-cathode dans le cas d'un photomultiplicateur ou d'une surface semi-conductrice) et 3 est un facteur arbitraire qui permet de garantir une discrimination à 99% entre S_{\min} et Offset. Pour résoudre un tel problème les solutions de l'art connu réalisent :

- 1) un choix judicieux des liquides,
- 2) un choix du marqueur,
- 3) une augmentation du temps de mesure pour accumuler des photons,
- 4) une augmentation de la puissance d'excitation pour collecter plus de photons.

Mais le principal facteur de limitation du seuil de détection est la non-reproductibilité des mesures, qui, pour de faibles niveaux de signaux, devient très vite dominante. Cette non reproductibilité provient essentiellement d'un mauvais repositionnement mécanique de la cuve de mesure et de la lumière qui est

B 14352.3 DB

6

collectée par le ménisque liquide dans cette cuve et qui est dirigée dans l'espace de façon aléatoire.

Une solution pour réduire de telles non-reproductibilités consiste à réaliser l'injection dans la cuve d'un plus grand volume de solution. Mais une telle injection est insuffisante pour obtenir une bonne sensibilité. De plus il n'est pas toujours possible ou souhaitable de travailler avec des grands volumes.

Le positionnement mécanique n'est pas améliorable facilement. De plus dans une telle solution on ne traite pas, alors, des variations provoquées, par exemple, par l'éclairage ambiant et la variation de la forme du ménisque.

Une autre solution pour réduire de telles non-reproductibilités consiste à utiliser des cuves comprenant une fenêtre transparente en verre « noir », qui corresponde à la zone considérée pour la mesure. Mais cette solution réduit le flux de photons collecté par le système de mesure, et donc élève la limite de détection. De plus, elle ne permet pas de connaître les variations de l'« offset », qui peuvent être causées par une modification de la lumière ambiante, par un mauvais état de surface des faces de la cuve (salissures, rayures etc.), par une diffusion provenant du ménisque et des parois.

Ainsi ces différentes solutions de l'art connu ne permettent ni une bonne sensibilité, ni une bonne reproductibilité des mesures.

L'invention a pour objet de pallier ces inconvénients en proposant un nouveau procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique qui utilise un

B 14352.3 DB

7

dispositif d'enregistrement spatial de l'image de l'interaction entre la lumière issue d'une source et de cet échantillon comme moyen pour sélectionner les informations utiles.

5 EXPOSÉ DE L'INVENTION

L'invention concerne un procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique, comportant les étapes suivantes :

- introduction éventuelle de l'échantillon
- 10 dans une cuve dont toutes les faces sont transparentes,
- éclairage de l'échantillon au moyen d'un faisceau lumineux issu d'une source,
- caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, les étapes suivantes :
- 15 - réalisation d'une image comprenant l'image de la lumière diffusée par l'échantillon,
- analyse de l'image selon des critères de référence,
- extraction d'une information spécifique à
- 20 l'interaction faisceau lumineux/échantillon,
- calcul du dosage.

Dans ce procédé la diffusion peut être une diffusion Raman, une diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire ou particulaire. L'analyse peut

25 consister en l'étude de la structure spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image. Le calcul du dosage peut se faire par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité

30 d'échantillon. Le calcul du dosage peut également se

B 14352.3 DB

8

faire par rapport à l'analyse de la cinétique de la réaction biologique ou chimique.

Dans ce procédé, avantageusement, on définit une première zone d'intérêt autour de la zone
5 de volume excité, et une seconde zone d'intérêt disposée à côté de cette première zone, et on mesure le signal spécifique en réalisant la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première zone et la somme de tous les pixels de la seconde zone.

10

L'invention présente les avantages suivants :

- Elle permet d'atteindre une limite de détection expérimentale beaucoup plus faible que celle
15 des systèmes conventionnels.

- Elle permet de réaliser un dosage en utilisant un grand volume de solution avec un grand débit, et donc d'envisager des applications comme une analyse des eaux de rivière, des systèmes d'aération
20 dans des immeubles.

- Elle n'impose pas de focaliser la lumière dans un petit volume. Le photo-blanchiment des molécules fluorescentes est donc très faible.

- Elle permet, du fait de la géométrie de
25 la cuve, d'exciter simultanément un grand nombre de molécules, ce qui permet de collecter de nombreux photons.

- Ni l'auto-fluorescence, ni la diffusion Raman du milieu liquide ne sont une limitation à la
30 sensibilité de l'invention. Elle permet donc de

B 14352.3 DB

9

travailler avec tous les marqueurs du commerce, ce qui réduit les contraintes de marquage.

- Les non-reproductibilités dues à la mécanique de la cuve, le nettoyage ou l'altération de faces optiques de la cuve, et la présence d'artefacts (bulles, poussières) ne sont plus une contrainte. L'invention permet, par analyse d'image, de les réduire voire de les supprimer. Un décalage de la position de la cuve devant le système de mesure de l'invention ou une translation de la lumière d'excitation du milieu peut être totalement corrigé après mesure de la position de la trace fluorescente dans l'image enregistrée. De même, des poussières présentes dans le volume excité, qui pourraient modifier de façon significative la mesure, sont de petite taille devant le volume excité, et peuvent ainsi être repérées et retirées de la mesure sans perdre celle-ci, ce qui est impossible à réaliser avec un mono-détecteur. En cas d'altération des faces optiques de la cuve, qui peut entraîner une modification de la quantité de lumière qui excite effectivement l'échantillon, l'invention permet de connaître les variations de la puissance effective et de corriger la mesure.

- Les variations de lumière ambiante causées soit par l'échantillon soit par l'environnement sont compensées, par une mesure dans l'image, puis un retrait des « offsets » possibles.

- L'analyse de l'information dans une image peut être conduite à partir d'éléments déterminés à l'avance (fonction d'éclairement, positions prédéterminées des différentes zones utiles), ou de

B 14352.3 DB

10

façon dynamique pour faire face à des perturbations aléatoires et/ou imprévues par application de méthodes de traitement des images (maximisation de l'entropie, réseau de neurones).

- 5 - La dynamique de dosage de l'invention, qui, pour un certain type de mesures, permet d'atteindre expérimentalement une dynamique de dosage biologique de 2 200, est très supérieure à celle de l'art connu, qui, pour un même type de mesures, est
10 comprise typiquement entre 5 et 10.

L'invention est applicable dans de nombreux domaines, et notamment :

- dans tous les domaines où il est utile de faire la mesure d'une solution fluorescente,
- 15 - en biologie, plus particulièrement pour le dosage de molécules biologiques ou d'intérêt biologique : antigènes, anticorps, peptides, ADN, cellules, bactéries..., pour le diagnostic clinique,
- en chimie (dosage),
- 20 - en pharmacie : dosage d'activité, contamination...,
- en physique : recherche de traces de produits, fluidique, analyse de mélange...

25 BÈVE DESCRIPTION DES DESSINS

La figure 1 illustre une vue de dessus d'un premier mode de réalisation d'un dispositif mettant en œuvre le procédé de l'invention.

- 30 Les figures 2 et 3 illustrent une image de la cuve obtenue avec le dispositif d'enregistrement d'image représenté sur la figure 1.

B 14352.3 DB

11

Les figures 4 à 6 illustrent un second mode de réalisation d'un dispositif mettant en œuvre le procédé de l'invention.

La figure 7 illustre un troisième mode de réalisation d'un dispositif mettant en œuvre le procédé de l'invention.

Les figures 8 à 10 illustrent trois exemples de réalisation d'un dispositif mettant en œuvre le procédé de l'invention.

10

EXPOSÉ DÉTAILLÉ DE MODES DE RÉALISATION PARTICULIERS

Le procédé de l'invention est un procédé de dosage (mesure d'une concentration ou d'une quantité) d'un échantillon biologique ou d'intérêt biologique (antigènes, anticorps, peptides, ADN, cellules, bactéries, toxines) ou chimique (solvant, gaz dissous, formulation, activité chimique), qui peut être un solide, un liquide, un gel...

Dans un premier mode de réalisation illustré sur la figure 1, un échantillon 10 est éclairé par un faisceau lumineux 17 issu d'une source 11 accordée avec le fluorochrome employé. On peut utiliser par exemple un laser Argon 488 nm pour de la fluorescéine ou un laser Hélium-Néon à 633 nm pour du Cy5. L'échantillon 10 est placé dans une cuve 12, par exemple de section rectangulaire dont toutes les faces sont transparentes. La section de cette cuve 12 peut, en effet, être rectangulaire, carrée, cylindrique ou elliptique. Un système d'objectif 13, équipé d'un filtre d'arrêt 14, est monté devant un dispositif d'enregistrement de la structure spatiale d'une image

B 14352.3 DB

12

15, par exemple une caméra CCD ou un système à balayage, relié à un organe de traitement 16. Le dispositif 15 qui reçoit le faisceau 18 diffusé par l'échantillon 10, permet l'enregistrement d'une image
5 de laquelle peut être extraite un signal spécifique de mesure.

Le procédé de l'invention comprend les étapes suivantes :

- éclairage de l'échantillon 10 au moyen
10 du faisceau lumineux 17 issu de la source 11, qui peut être un laser à gaz, un laser solide, une diode laser, une diode électroluminescente, une diode organique, une lampe spectrale comme une lampe halogène, à mercure, à xénon, à deutérium,
- réalisation d'une image du faisceau
15 lumineux 18 diffusé par l'échantillon 10, l'origine de la diffusion pouvant être une diffusion Raman, une diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire (diffusion Rayleigh) ou particulière (utilisation de
20 nano-particules),
- analyse de l'image par rapport à des références, cette analyse consistant alors en l'étude de la structure spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image,
25 ces références étant constituées, par exemple, par l'expérience d'un utilisateur ou par des critères morphologiques (forme et position d'une trace lumineuse), photométrique (fréquences des variations spatiales de la lumière dans l'image), statistiques
30 (variation d'estimateurs de mesures, d'entropie dans l'image),

B 14352.3 DB

13

- extraction de l'information spécifique à l'interaction entre le faisceau 17 et l'échantillon 10, cette extraction consistant, par exemple, en des opérations arithmétiques entre l'image et d'autres
5 images ou des constantes (par exemple, des soustractions, additions, divisions, multiplications), morphologiques (érosion, dilatation, binarisation, détourage, segmentations, correction de décalage) ou photométriques (corrections polynomiales, convolutions,
10 filtres, seuillages),

- calcul du dosage, ce calcul se faisant par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité de l'échantillon biologique ou chimique. Ce calcul peut
15 aussi être effectué en enregistrant la cinétique de la réaction biologique ou chimique et en analysant cette cinétique par des méthodes connues de l'homme de l'art.

Dans le procédé de l'invention la mesure est faite dans une image obtenue par le dispositif
20 d'enregistrement de la structure spatiale d'une image 15. L'invention ne réside pas dans l'emploi d'un tel dispositif 15 mais principalement dans :

- le fait d'enregistrer le faisceau 18 diffusé par l'échantillon 10 sous la forme d'une image,
25 - le fait d'extraire l'information de cette image,
- le côté adaptatif obtenu par l'application d'une analyse de l'image.

La figure 2 illustre l'image de la cuve 12
30 obtenue avec le dispositif d'enregistrement de la structure spatiale d'une image 15. La cuve peut avoir

B 14352.3 DB

14

des dimensions plus petites que celles de l'image. Elle peut par exemple être remplacée par un ou plusieurs capillaires.

De plus, le faisceau lumineux peut être
5 indifféremment plus petit ou plus grand que la cuve.

Dans cette image on peut distinguer plusieurs zones :

- une zone 20 de volume éclairé, qui correspond au volume de la cuve 12 excité par le
10 faisceau 17,
- la zone 21 d'entrée de ce faisceau 17 dans la cuve 12,
- la zone 22 de sortie de ce faisceau 17 de la cuve 12,
- 15 - une zone 23 de ménisque,
- une zone 24 d'artefact.

On peut ainsi, comme illustré sur la figure 3, définir une première région d'intérêt 25 autour de la zone 20 de volume éclairé et une deuxième région
20 d'intérêt 26 disposée à côté de cette zone 25. La mesure du signal spécifique est alors donné par le calcul : $\Sigma RI_1 - \Sigma RI_2$; c'est-à-dire la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première région d'intérêt 25 et la somme de tous les pixels de la
25 seconde région d'intérêt 26.

Sur la figure 3 les deux régions d'intérêt 25 et 26 ont la même taille, ce qui n'est pas indispensable. Lorsque ces régions n'ont pas la même taille, il suffit soit de réaliser un moyennage des
30 niveaux de gris de chaque région, soit une pondération des valeurs par le nombre de pixels.

B 14352.3 DB

15

L'analyse de l'image ainsi représentée conduit à certaines observations :

- La trace fluorescente du faisceau lumineux (zone 20) donne le signal spécifique.
- 5 - Le ménisque (zone 23), délimitant le liquide de l'air, est fortement lumineux. Son origine provient de ladite trace. La forme de ce ménisque est fortement aléatoire. L'amplitude du signal provenant de ce ménisque est donc très variable.
- 10 - Un artefact (zone 24) peut être, pour un montage donné, une rondelle ressort destinée à assurer un bon positionnement mécanique de la cuve 12.

- Les zones 21 et 22 correspondent respectivement aux points d'entrée et de sortie du
15 faisceau lumineux dans la cuve 12.

Avec un autre réglage des seuils d'affichage, on peut mieux mettre en évidence les niveaux de lumière les plus faibles.

- Le procédé de l'invention permet
20 d'améliorer le coefficient de variation CV (écart type/moyenne). En effet le coefficient CV obtenu avec le procédé de l'invention est bien inférieur au coefficient CV calculé en faisant la somme de tous les pixels d'une caméra CCD, qui correspond à une mesure
25 faite avec un mono-détecteur. Le coefficient CV obtenu avec le procédé de l'invention est d'ailleurs du même ordre de grandeur que celui obtenu avec un grand volume de solution, comme envisagé précédemment dans l'introduction de ladite demande. Ce coefficient CV
30 obtenu avec le procédé de l'invention est plus faible que celui obtenu par la mesure dans chacune des zones

B 14352.3 DB

16

d'intérêt 25 et 26. La soustraction des mesures effectuées dans ces deux zones d'intérêt permet de corriger des variations d'éclairage qui affectent toutes les régions. L'invention permet d'effectuer
5 ainsi un filtrage spatial dans le plan qui permet d'extraire le signal contenant l'information spécifique du phénomène de fluorescence. De plus l'invention permet d'extraire les régions d'intérêt qui sont vraiment pertinentes dans une image ou une pseudo-
10 image, alors qu'un système de mesure utilisant un seul détecteur mono-pixel ne peut pas réaliser une telle fonction.

Dans un second mode de réalisation, un mono-détecteur associé à une matrice de pixels à
15 transparence programmable 30 telle qu'une matrice de cristaux liquides ou de micro-miroirs ou tout autre système équivalent est disposé devant la cuve 12 illustrée sur la figure 4. Cette matrice 30 est intercalée entre la cuve 12 et le détecteur via un
20 système de formation des images ou non. On réalise alors une première mesure en « ouvrant » les pixels correspondant à la première zone d'intérêt 25, comme illustré sur la figure 5, puis une deuxième mesure en ouvrant les pixels correspondant à la seconde zone
25 d'intérêt 26, comme illustré sur la figure 6.

L'emploi d'une telle matrice 30 à transparence variable permet d'éviter l'enregistrement systématique d'une image, en réalisant par exemple les étapes suivantes :

- 30 - enregistrement de l'image du faisceau diffusé par l'ouverture/fermeture successives de tous

B 14352.3 DB

17

les pixels de la matrice 30 en synchronisation avec la mesure effectuée par le mono-détecteur,

- analyse de l'image et définition de la ou des zones d'intérêt permettant d'extraire l'information
5 spécifique,

- enregistrement de tels paramètres pour une utilisation ultérieure,

- lors de l'analyse d'un échantillon donné, ouvertures successives des régions définies lors de
10 l'étape d'analyse et enregistrement des résultats de mesures pour chacune de ces zones,

- extraction de l'information utile,

- calcul du dosage.

Dans un troisième mode de réalisation
15 illustré sur la figure 7, deux détecteurs mono-pixel 35 et 36 observent chacun une région d'intérêt 25 ou 26. Deux moyens de formation d'image 37 et 38 sont placés respectivement devant chacun de ces deux détecteurs 35 et 36. La mesure du signal provenant de la première
20 région d'intérêt 25 est faite avec le détecteur 35, celle pour la seconde région d'intérêt 26 est faite avec le détecteur 36. La zone 39 représente la trace fluorescente en vue de face.

L'invention permet d'adapter l'extraction
25 du signal spécifique aux conditions d'expériences. Par exemple, si la cuve a bougé entre deux séries de mesures, il est possible, par analyse automatique de l'image, de repositionner les régions d'intérêt de manière automatique, opération impossible à effectuer
30 avec un système statique.

B 14352.3 DB

18

Exemples de réalisation de l'invention

Les trois exemples de réalisation décrits ci-dessous correspondent respectivement aux trois modes de réalisation définis précédemment.

5 Dans un premier exemple de réalisation illustré sur la figure 8, une source lumineuse 40, par exemple un laser ou une diode électroluminescente, excite, dans une cuve 41, le liquide contenant des molécules fluorescentes au travers d'optiques de mise
10 en forme non représentées, et de divers accessoires tels qu'un obturateur 42, et un diaphragme 43. Un premier objectif 44, disposé par exemple perpendiculairement à la direction principale du faisceau lumineux, collecte une partie de ce faisceau
15 lumineux, émis par les molécules fluorescentes dans la cuve 41. Un filtre d'arrêt 45 est disposé derrière le premier objectif 44, juste devant un second objectif 46. L'association des objectifs 44 et 46 permet de former une image de la cuve 41 sur le détecteur d'image
20 47 qui est relié à un système de commande et de contrôle 49. Pour une cuve 41 d'une largeur intérieure de 1 cm, ce détecteur 47 peut être un détecteur de 512 x 512 pixels de 10 µm de côté. Le premier objectif 44 peut avoir une focale 50 mm et le second objectif 46
25 une focale 25 mm.

Dans un second exemple de réalisation, illustré sur la figure 9, dont la configuration est la même que celle de la figure 8 pour l'excitation, on n'utilise qu'un seul détecteur. Une matrice à
30 transparence variable 56, qui peut être une matrice à cristaux liquide ou une matrice de micro-miroirs, joue

B 14352.3 DB

19

le rôle d'un diaphragme de champ. La matrice 56 peut être remplacée par une fente mobile actionnée par un actuateur mécanique ou électro-mécanique, par exemple, un électro-aimant ou un moteur électrique.

5 Dans un troisième exemple de réalisation illustré sur la figure 10, la configuration pour exciter l'intérieur de la cuve 41 est la même que pour la figure 8 et la configuration pour la collection de lumière est la même que pour celle de la figure 9. Deux
10 mono-détecteurs 50 et 51, par exemple des photomultiplicateurs décalés, permettent d'observer deux régions différents de la cuve 41. Devant chaque détecteur 50 et 51, une optique de reprise 52 et 53
15 permet de former l'image de la région d'intérêt sur un diaphragme de champ 54 et 55 qui limite la région observée. Un filtre d'arrêt peut être disposé avant, dans ou derrière le diaphragme. La zone 56 représente la trace fluorescente.

B 14352.3 DB

20

REFERENCES

- 5 [1] "Some applications of near-ultraviolet laser-induced fluorescence detection in nanomolar- and subnanomolar-range high-performance liquid chromatography or micro-high performance liquid chromatography" de N. Siméon, R. Myers, C. Bayle, M. Nertz, J.K. Stewart, F. Couderc (2001, Journal of Chromatography A, Vol 913, I 1-2, pages 253-259).
- 10 [2] "Performance of an integrated microoptical system for fluorescence detection in microfluidic systems" de J.C. Roulet, R. Volkel, H.P. Herzig, E. Verpoorte, N.F. Rooij, R. Dandliker (2002, Analytical Chemistry, Vol. 74 (14), pages 3400-3407).
- 15 [3] "Single molecule detection of specific nucleic acid sequences in unamplified genomic DNA" de A. Castro, et J.G. Williams (1997, Analytical chemistry, Vol. 69 (19), pages 3915-3920).
- 20

B 14352.3 DB

21

REVENDICATIONS

1. Procédé de dosage d'un échantillon biologique ou chimique, comportant une étape
5 d'éclairement de l'échantillon (10) au moyen d'un faisceau lumineux (17) issu d'une source (11), caractérisé en ce qu'il comporte, en outre, les étapes suivantes :
- réalisation d'une image comprenant
10 l'image du faisceau (18) diffusé par l'échantillon (10),
 - analyse de l'image selon des critères de référence,
 - extraction d'une information spécifique à
15 l'interaction faisceau lumineux/échantillon,
 - calcul du dosage,
- et en ce que l'analyse consiste en l'étude de la structure spatiale de l'image et de la distribution de l'énergie lumineuse dans cette image.
- 20
2. Procédé selon la revendication 1, qui comporte une étape préalable d'introduction de l'échantillon (10) dans une cuve (12) dont toutes les faces sont transparentes.
- 25
3. Procédé selon la revendication 1, dans lequel la diffusion est une diffusion Raman, une diffusion par fluorescence, une diffusion moléculaire ou particulaire.
- 30

B 14352.3 DB

22

4. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le calcul du dosage se fait par rapport à un étalonnage entre la mesure d'énergie lumineuse et la concentration ou la quantité d'échantillon.

5

5. Procédé selon la revendication 1, dans lequel le calcul du dosage se fait par rapport à l'analyse de la cinétique de la réaction biologique ou chimique.

10

6. Procédé selon la revendication 1, dans lequel on définit une première zone d'intérêt (25) autour de la zone de volume excité, et une seconde zone d'intérêt (26) disposée à côté de cette première zone, et on mesure le signal spécifique en réalisant la soustraction entre la somme de tous les pixels de la première zone (25) et la somme de tous les pixels de la seconde zone (26).

15

7. Application du procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes à la fluorescence.

20

25

1 / 4

FIG. 1

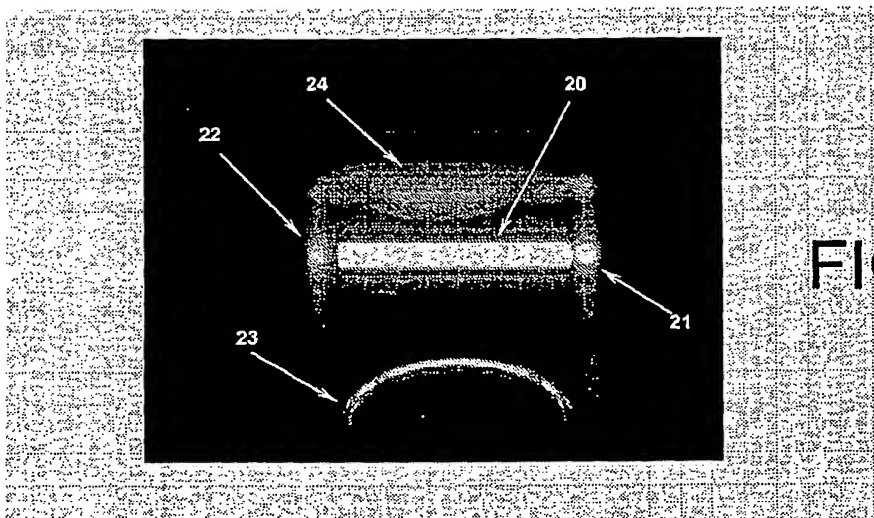
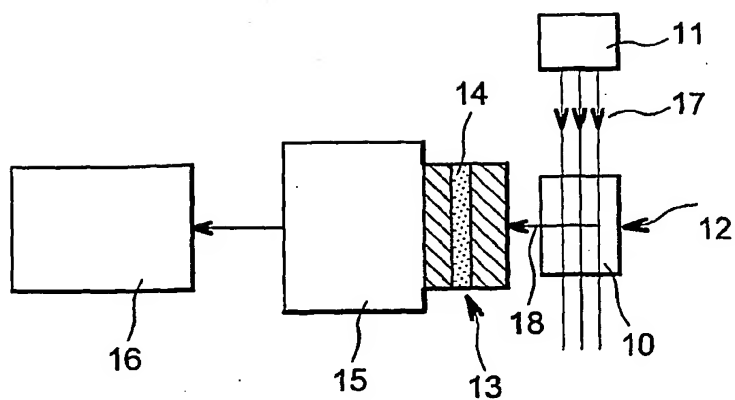
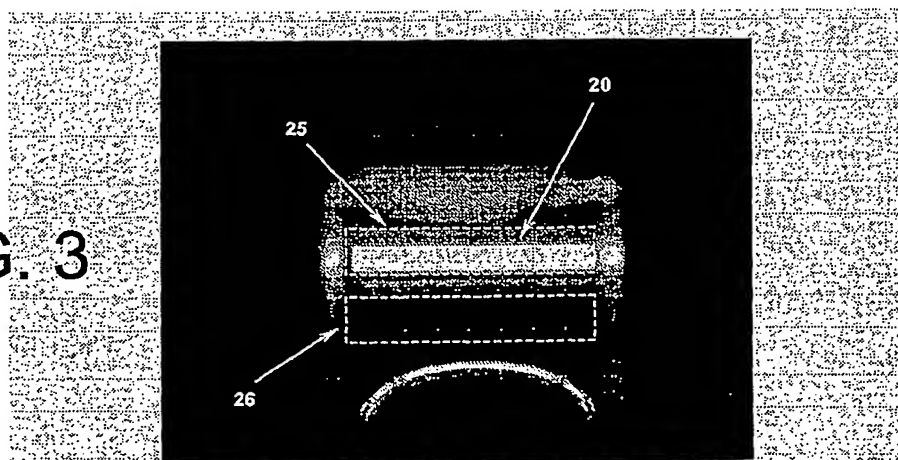


FIG. 2

FIG. 3



THIS PAGE BLANK (USPTO)

2 / 4

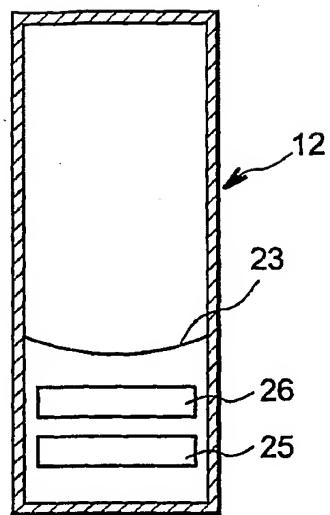


FIG. 4

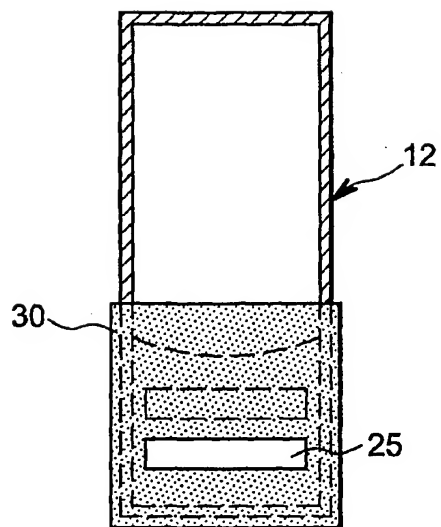


FIG. 5

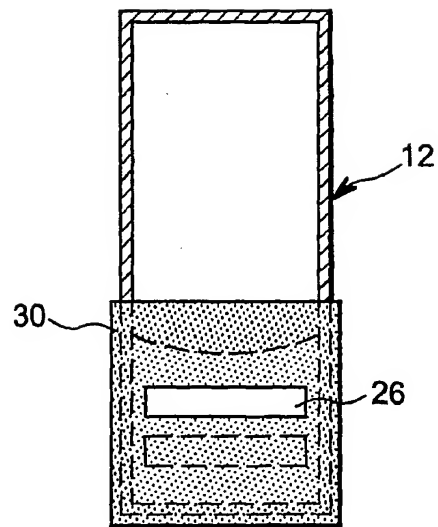


FIG. 6

THIS PAGE BLANK (USPTO)

3 / 4

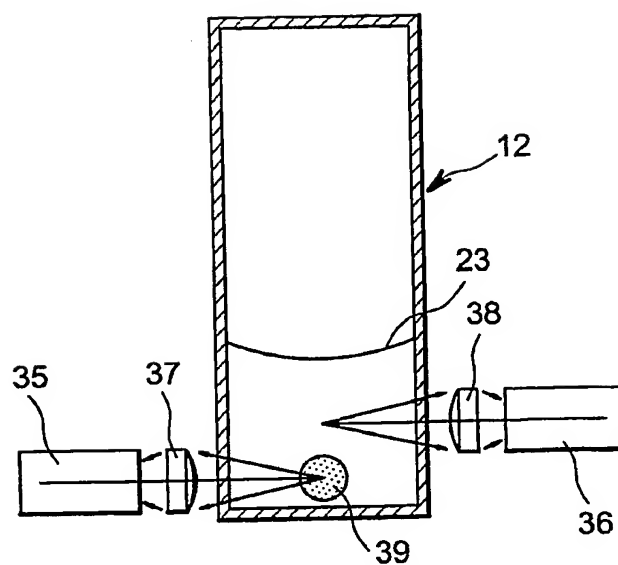


FIG. 7

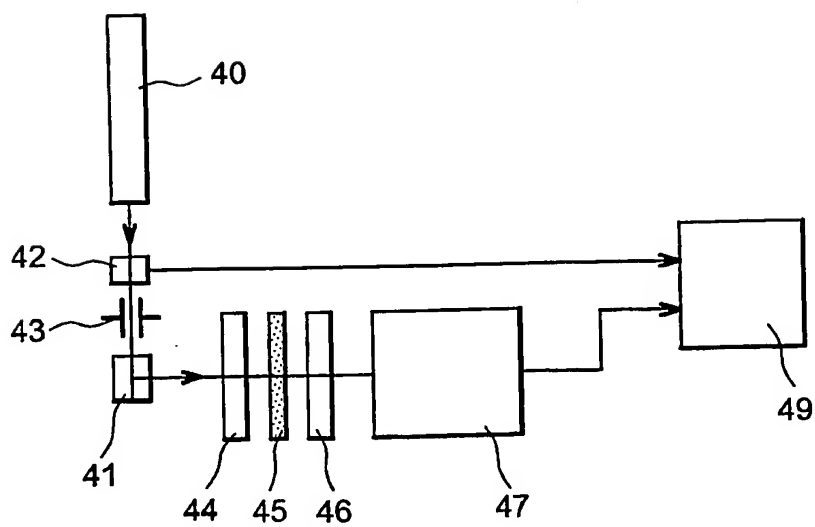


FIG. 8

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4 / 4

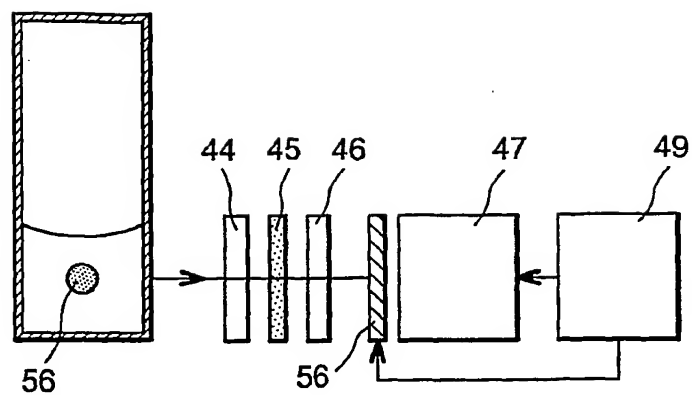


FIG. 9

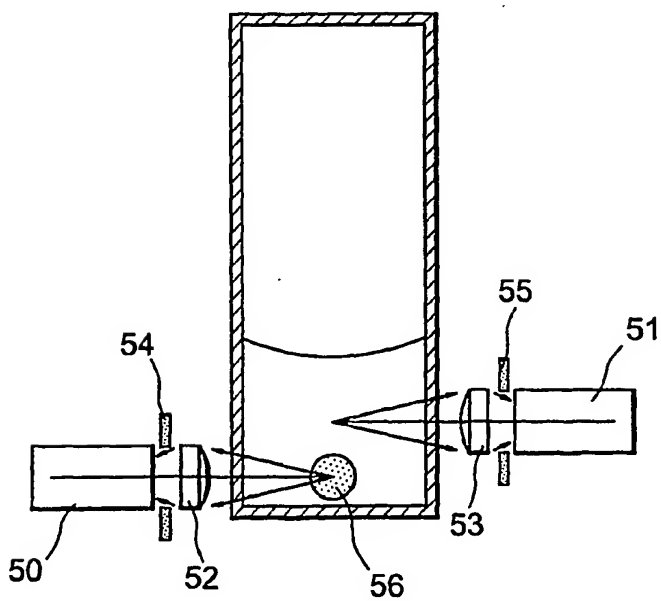


FIG. 10

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/FR2004/050289

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
IPC 7	G01N21/64	G01N21/65 G01N21/51 G01N27/447 G01N15/02
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)		
IPC 7 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
EPO-Internal, INSPEC		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 5 097 135 A (MAKINO TOHRU ET AL) 17 March 1992 (1992-03-17)	1-4,6,7
Y	column 2, line 29 - line 34 column 5, line 7 - line 10 column 8, line 20 - line 23 column 9, line 43 - column 10, line 15 column 10, line 67 - column 11, line 27 column 11, line 43 - line 51 column 12, line 13 - line 18	5
Y	FR 2 522 150 A (STRAHLEN UMWELTFORSCH GMBH) 26 August 1983 (1983-08-26) page 1, line 4 - line 11 page 2, line 11 - line 17	5
-/--		
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance *E* earlier document but published on or after the international filing date *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art. *&* document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search		Date of mailing of the international search report
15 November 2004		23/11/2004
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3016		Authorized officer Navas Montero, E

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/FR2004/050289

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	US 5 827 660 A (POLITZ JOAN C ET AL) 27 October 1998 (1998-10-27) column 2, line 37 - line 49 column 3, line 24 - line 25 column 6, line 12 - line 27	1-7
A	ULANOWSKI Z ET AL: "LASER DIFFRACTOMETER FOR SINGLE-PARTICLE SCATTERING MEASUREMENTS" MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, IOP PUBLISHING, BRISTOL, GB, vol. 13, no. 3, March 2002 (2002-03), pages 292-296, XP001163542 ISSN: 0957-0233 page 293, left-hand column, line 9 - line 19	1
A	US 3 797 937 A (SHOFNER F) 19 March 1974 (1974-03-19) column 2, line 51 - line 54 column 8, line 8 - line 12 figure 4	1

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/FR2004/050289

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US 5097135	A	17-03-1992	JP 2799191 B2 JP 3081648 A DE 4026564 A1 FR 2651321 A1	17-09-1998 08-04-1991 28-02-1991 01-03-1991
FR 2522150	A	26-08-1983	DE 3206407 A1 CH 658912 A5 FR 2522150 A1	01-09-1983 15-12-1986 26-08-1983
US 5827660	A	27-10-1998	AU 4042297 A WO 9806875 A1	06-03-1998 19-02-1998
US 3797937	A	19-03-1974	NONE	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Commande Internationale No
PCT/FR2004/050289

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE
CIB 7 G01N21/64 G01N21/65 G01N21/51 G01N27/447 G01N15/02

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)
CIB 7 G01N

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)
EPO-Internal, INSPEC

C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
X	US 5 097 135 A (MAKINO TOHRU ET AL) 17 mars 1992 (1992-03-17)	1-4,6,7
Y	colonne 2, ligne 29 - ligne 34 colonne 5, ligne 7 - ligne 10 colonne 8, ligne 20 - ligne 23 colonne 9, ligne 43 - colonne 10, ligne 15 colonne 10, ligne 67 - colonne 11, ligne 27 colonne 11, ligne 43 - ligne 51 colonne 12, ligne 13 - ligne 18	5
Y	FR 2 522 150 A (STRAHLEN UMWELTFORSCH GMBH) 26 août 1983 (1983-08-26) page 1, ligne 4 - ligne 11 page 2, ligne 11 - ligne 17	5
	----- -/--	

☒ Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents

☒ Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

* Catégories spéciales de documents cités:

- *A* document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- *E* document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- *L* document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- *O* document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- *P* document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- *T* document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- *X* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- *Y* document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- *Z* document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

15 novembre 2004

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

23/11/2004

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Navas Montero, E

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050289

C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie *	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
-------------	--	-------------------------------

A	<p>US 5 827 660 A (POLITZ JOAN C ET AL) 27 octobre 1998 (1998-10-27) colonne 2, ligne 37 - ligne 49 colonne 3, ligne 24 - ligne 25 colonne 6, ligne 12 - ligne 27</p>	1-7
---	---	-----

A	<p>ULANOWSKI Z ET AL: "LASER DIFFRACTOMETER FOR SINGLE-PARTICLE SCATTERING MEASUREMENTS" MEASUREMENT SCIENCE AND TECHNOLOGY, IOP PUBLISHING, BRISTOL, GB, vol. 13, no. 3, mars 2002 (2002-03), pages 292-296, XP001163542 ISSN: 0957-0233 page 293, colonne de gauche, ligne 9 - ligne 19</p>	1
---	--	---

A	<p>US 3 797 937 A (SHOFNER F) 19 mars 1974 (1974-03-19) colonne 2, ligne 51 - ligne 54 colonne 8, ligne 8 - ligne 12 figure 4</p>	1
---	---	---

RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

Demande Internationale No

PCT/FR2004/050289

Document brevet cité au rapport de recherche		Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
US 5097135	A	17-03-1992	JP 2799191 B2	17-09-1998
			JP 3081648 A	08-04-1991
			DE 4026564 A1	28-02-1991
			FR 2651321 A1	01-03-1991
FR 2522150	A	26-08-1983	DE 3206407 A1	01-09-1983
			CH 658912 A5	15-12-1986
			FR 2522150 A1	26-08-1983
US 5827660	A	27-10-1998	AU 4042297 A	06-03-1998
			WO 9806875 A1	19-02-1998
US 3797937	A	19-03-1974	AUCUN	

THIS PAGE BLANK DISPTON

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☐ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☒ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.

THIS PAGE BLANK (USPTO)